

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 199 52 322 A 1

51 Int. Cl. 7:  
B 01 D 57/02  
G 01 N 27/447  
G 01 N 21/17  
G 01 N 15/00

21 Aktenzeichen: 199 52 322.3  
22 Anmeldetag: 29. 10. 1999  
43 Offenlegungstag: 17. 5. 2001

71 Anmelder:  
EVOTEC BioSystems AG, 22525 Hamburg, DE  
74 Vertreter:  
v. Bezold & Sozien, 80799 München

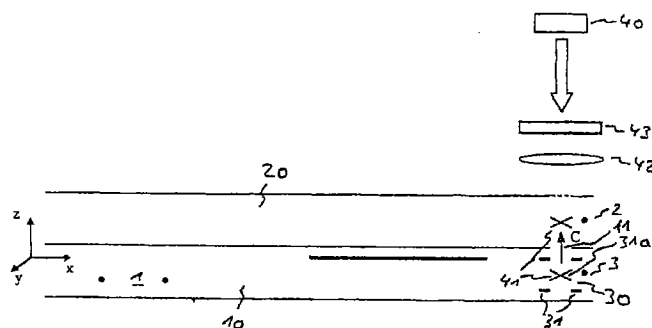
72 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden  
56 Entgegenhaltungen:  
EP 08 27 371 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zur Partikeltrennung

57 In einem Partikelgemisch (1) aus einer Vielzahl von Partikeln in einem fluidischen Mikrosystem werden Zielpartikel (2) mit vorbestimmten Partikeleigenschaften von Restpartikeln (3) getrennt. Es erfolgen ein Positionieren von Partikeln in Beobachtungsfeldern an Funktionselementen (30) in einer ersten Kanalstruktur (10), wobei die Funktionselemente Elektrodenanordnungen aufweisen, an denen inhomogene elektrische Felder erzeugt werden, die dielektrophoretische Kräfte auf die Partikel ausüben, ein Vermessen der Partikel zur Ermittlung der Partikeleigenschaften mit einer Erfassung der Beobachtungsfelder, die die Zielpartikel (1) bzw. die Restpartikel (3) enthalten, ein Ausbilden optischer Käfige an den Beobachtungsfeldern, die die Ziel- oder Restpartikel enthalten, und ein gleichzeitiges Übertragen der Ziel- oder Restpartikel in eine benachbarte zweite Kanalstruktur (20), wobei optische Kräfte der optischen Käfige und dielektrische Polarisationskräfte der Funktionselemente (30) zusammenwirken.



DE 199 52 322 A 1

DE 199 52 322 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Trennen von Partikelgemischen nach bestimmten Partikeleigenschaften, insbesondere ein Trennverfahren für Gemische mikroskopisch kleiner Partikel in fluidischen Mikrosystemen, und eine Trenneinrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Eine häufig bei biologischen oder medizinischen Untersuchungen, in der Diagnostik sowie in biotechnologischen Prozessen gestellte Aufgabe besteht in der Trennung von Suspensionsgemischen durch Verteilung oder Sortierung von Zellen oder Mikropartikeln aus einer großen Ausgangsmenge in bestimmte Gruppen mit jeweils den gleichen Eigenschaften. Beispielsweise kann die Transfektion einer Zelllinie oft nur unvollständig durchgeführt werden, so daß vor einer weiteren Bearbeitung oder Nutzung dieser Zelllinie die erfolgreich transfizierten Zellen von den nicht erfolgreich bearbeiteten Zellen getrennt werden müssen. Insbesondere das Aussortieren selten vorkommender Individuen stellt eine sehr hohe Anforderung an das Trennverfahren hinsichtlich der Reinheit und Homogenität der Zielfraktion. Ein weiteres Beispiel im medizinischen Bereich ist mit der Knochenmarkstransplantation gegeben, bei der Stammzellen von einer großen Zahl anderer Zellen getrennt werden müssen. Auch bei der Analyse von fetalen Zellen im mütterlichen Blut müssen einige wenige fetale Zellen von dem Zellengemisch abgetrennt werden, das sich im mütterlichen Blut befindet. Eine wichtige Aufgabe in der Tumordiagnostik ist die Erkennung, das Aussortieren und die Analyse von metastasierenden Krebszellen im Blut des Patienten. Es sind verschiedene Methoden zur Trennung von Zellgemischen bekannt, die die Trennaufgabe jedoch nur unvollkommen lösen. Hierzu zählen insbesondere die Affinitätschromatographie, Trennverfahren auf der Basis von Fluoreszenzmarkierungen wie zum Beispiel die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), auf der Basis von Markierung mit ferromagnetischen Partikeln, die Magnet aktivierte Zellsortierung (MACS) und mikroskopische Verfahren.

Die Affinitätschromatographie wie auch die MACS (oder: Panning-Verfahren) sind auf Trennvorgänge beschränkt, bei denen die Zellen an der Zelloberfläche ein Molekül exprimieren, das eine Affinität zu einer weiteren, bekannten oder unbekannten Substanz besitzt. Bei der Affinitätschromatographie wird diese Substanz auf eine Chromatographiematrix, zum Beispiel auf der Basis von Beads, aufgebracht. Eine Suspension der zu trennenden Zellen wird über diese Matrix gegeben, so daß die exprimierenden Zellen daran haften, während die anderen Zellen fort gespült werden. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht neben der Beschränkung auf zelluläre Systeme mit einer Oberflächenexpression von Molekülen, in der hohen mechanischen Belastung der Zellen und der geringen Trennschärfe der Chromatographie. Die Trennschärfe ist schwach, da viele Zellen mit geringer Affinität unspezifisch an der Matrix hängenbleiben, die eigentlich nicht zu den abzutrennenden Zellen gehören. In der Praxis ist die Affinitätschromatographie auf die Trennung von mechanisch wenig empfindlichen Bakterien beschränkt.

Beim Magnet-aktivierte Trennen von Zellen wird die Zellsuspension mit mikrometergroßen Magnetpartikeln, auf die die affine Substanz aufgebracht ist, gemischt und die Magnetpartikel zusammen mit den Zielzellen mithilfe eines außerhalb des Reaktionsgefäßes befindlichen Magneten abgetrennt. Auch hier ist die Verschleppung unspezifisch anhaftender Zellen an die Magnetpartikel eine erhebliche Einschränkung des Verfahrens hinsichtlich der Reinheit der Zielfraktion.

Beim Fluoreszenz-aktivierte Trennen von Zellen

(FACS) werden diese in einem Flüssigkeitsstrom durch eine dünne Kapillare transportiert, wobei der Regel noch ein weiterer, zellfreier Hüllstrom vorgeschoben ist. Dieser Strom wird von einem Tropfengenerator in Zeltropfen zerlegt, die aus der Kapillare in einen freien Meßraum emittiert werden. Die Tropfen passieren im Flug eine optische Meßstrecke, in der sie einer Streulicht- und/oder Fluoreszenzlichtmessung unterzogen werden. Hierzu werden ein oder mehrere Laser auf die Flugbahn der Tropfen in der optischen Meßfläche fokussiert. Die gemessenen Streulicht- und/oder Fluoreszenzintensitäten erlauben die Feststellung, ob bestimmte Zelleigenschaften gegeben sind oder nicht. In Abhängigkeit vom Meßergebnis wird eine nach der Meßstrecke angeordnete Verteilereinrichtung, zum Beispiel auf der Basis einer mechanischen Prallplatte oder einer elektrostatischen Ablenkvorrichtung, betätigt.

Der Nachteil der fluoreszenzaktivierten Zelltrennung besteht darin, daß es sich um ein serielles Verfahren handelt. Der optische Aufwand für die Meßstrecke ist so groß, daß eine Parallelisierung für praktische Anwendungen zu aufwendig ist. Entsprechendes gilt für die Tropfenerzeugung und die Verteilereinrichtung. Um beispielsweise 10000 Zellen pro Sekunde analysieren zu können, muß bei einer seriellen Verfahrensweise die Meßzeit auf 100 ms oder weniger beschränkt werden. In derart kurzen Zeitbereichen sind Messungen zwar möglich, aber auch mit relativ großen Fehlern behaftet, so daß die Trennschärfe des Verfahrens negativ beeinflusst wird.

Die mikroskopische Zelltrennung basiert darauf, eine zweidimensionale Schicht von Zellen (sogenannter Zellrasen) zu bilden und mit einem Mikroskop abzurastern. Von jeder Zelle wird ein Bild aufgenommen, das einer Bildauswertung zur Feststellung vorbestimmter Zelleigenschaften unterzogen wird. Je nach dem Auswertungsergebnis wird eine Pickvorrichtung dazu verwendet, einzelne Zellen nach der Messung aus dem Zellrasen zu lösen und einem Zielort zuzuführen. Eine besonders hohe Auflösung bei der Bildaufnahme wird durch Einsatz der konfokalen Mikroskopie erzielt. Auch dieses Verfahren besitzt Beschränkungen vor allem in bezug auf den Durchsatz der Pickvorrichtung. Ohne Zellen zu beschädigen, kann maximal im Rhythmus von ca. 10 s jeweils ein Pickvorgang erfolgen, der darüber hinaus eine mechanische Belastung der zu trennenden Zellen darstellt.

Die genannten Probleme treten nicht nur bei der Trennung von Zellgemischen, sondern allgemein bei der Trennung von Partikelgemischen natürlichen und/oder synthetischen Ursprungs auf.

In Fig. 7 ist ein aus der Mikrosystemtechnik allgemein bekanntes Prinzip der Verteilung von Partikeln illustriert. Ein fluidisches Mikrosystem 100' enthält eine erste Kanalstruktur 10' und eine zweite Kanalstruktur 20', die aneinandergrenzende, zum Beispiel nebeneinander oder übereinander angeordnete, Kanäle oder Kammern umfassen. Ein in einer Flüssigkeit suspendiertes Partikelgemisch 1' wird in der ersten Kammerstruktur 10' zu einem Feldkäfig 30' bewegt. Sobald ein Partikel im Feldkäfig 30' positioniert ist, erfolgen an dieser Beobachtungsposition eine Vermessung des Partikels mit elektrischen Mitteln und nach Freigabe des Partikels vom Feldkäfig 30' in Abhängigkeit vom Meßergebnis eine Ansteuerung einer Ablenkelektrode 40' derart, daß der Partikel in die zweite Kanalstruktur 20' überführt oder zur weiteren Bewegung in der ersten Kanalstruktur 10' verbleibt (siehe Pfeile). Dieses Verfahren ist wegen der seriellen Trennweise nachteilig. Soll das Trennverfahren gemäß Fig. 5 mit mehreren Feldkäfigen durchgeführt werden, so müßten entsprechend mehrere Ablenkelektroden selektiv verstimmbar werden. Dies ist jedoch wegen der elektrischen

Wechselwirkung benachbarter Strukturen in praktisch interessierenden Zeitbereichen nicht zuverlässig durchführbar und es würde zu unerwünschten Fehlrennungen kommen. Ein weiterer Nachteil besteht in der Beschränkung auf die Messung elektrischer Eigenschaften der Partikel im Mikrosystem.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Trennverfahren anzugeben, das sich durch einen hohen Durchsatz, eine hohe Trennschärfe und eine geringe mechanische Belastung der zu trennenden Partikel auszeichnet. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, eine Trennvorrichtung zur Implementierung eines derartigen Verfahrens anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren und eine Vorrichtung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht darin, eine Partikeltrennung in einem fluidischen Mikrosystem durchzuführen, in dem die zu trennenden Partikel zunächst einzeln oder gruppenweise in einer Vielzahl von Funktionselementen auf der Basis von Feldkäfigen oder anderen geeigneten Feldbarrieren durch negative Dielektrophorese positioniert und an dieser Beobachtungsposition (oder: in diesem Beobachtungsfeld) vermessen werden. Beim Vermessen werden vorbestimmte Eigenschaften der zu trennenden Partikel und dementsprechend die Positionen der Partikel ermittelt, die aus dem Gemisch zu trennen sind bzw. die Positionen der Partikel, die zum Restgemisch gehören. Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung werden die abzutrennenden Partikel auch Zielpartikel und die zum übrigen Gemisch gehörenden Partikel Restpartikel genannt. Um die Ziel- oder Restpartikel in eine benachbarte Kanalstruktur des Mikrosystems zu übertragen, werden die Ziel- oder Restpartikel nach der Vermessung einzeln oder simultan einer Laserbestrahlung zur Bildung jeweils eines optischen Käfigs unterzogen. Die Laserbestrahlung kann hierbei innerhalb eines Feldkäfigs, an einer Feldbarriere oder in Fließrichtung unmittelbar hinter einem Feldkäfig oder einer Feldbarriere erfolgen. Dementsprechend werden die Ziel- oder Restpartikel zusätzlich zu den elektrischen Feldkräften auch optischen Kräften ausgesetzt. Je nach Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Übertragung der Ziel- oder Restpartikel durch Verschiebung der optischen Käfige in die benachbarte Kanalstruktur oder durch Öffnen des elektrischen Feldkäfige hin zur benachbarten Kanalstruktur bei gleichzeitigem Festhalten der optischen Käfige. Diese Übertragung kann auch für mehrere Ziel- oder Restpartikel gleichzeitig erfolgen. Die Zielpartikel werden entsprechend in der benachbarten oder in der ursprünglichen Kanalstruktur des Mikrosystems gesammelt und weiter bearbeitet.

Gemäß einer Grundform der Erfindung erfolgt ein Verteilen der Ziel- bzw. Restpartikel in zwei Gruppen. Durch stufenweises Wiederholen der Trennung jeweils unter Bezug auf andere Partikeleigenschaften kann auch ein Sortieren in mehrere Ziel- bzw. Restpartikelgruppen erfolgen.

Eine Vorrichtung zur Partikeltrennung in fluidischen Mikrosystemen umfaßt erfindungsgemäß eine erste Kanalstruktur mit Elektrodeneinrichtungen zur Bildung einer Vielzahl von Funktionselementen (z. B. dielektrische Feldkäfige) eine benachbarte, zweite Kanalstruktur, die an den Positionen der Funktionselemente mit der ersten Kanalstruktur über Öffnungen verbunden ist, eine Lasereinrichtung, die zur Bildung optischer Käfige in jedem dielektrischen Feldkäfig ausgebildet ist, und eine Lichtmodulatoreinrichtung, mit der in jeder vorgegebenen Position der jeweiligen optische Käfig einzeln ein- bzw. ausgeschaltet werden kann.

Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Übertragung der Zielpartikel durch Einschalten der optischen Käfige in oder hinter den Feldkäfigen oder Feldbarrieren mit den Zielpartikeln, Einfangen der Zielpartikel in den optischen Käfigen und Verschieben der optischen Käfige in die zweite Kanalstruktur, während die Restpartikel in der ersten Kanalstruktur bleiben. Die zweite Kanalstruktur liegt dabei entweder in y-Richtung parallel seitlich zu der ersten (relativ zur Fließrichtung des Partikelstroms) versetzt. In diesem Fall geschieht das Verschieben der in den optischen Käfigen gehaltenen Partikel durch Verschieben der Vorrichtung in xy-Richtung relativ zur optischen Achse des Laserstrahls. Oder die zweite Kanalstruktur liegt in z-Richtung entlang der optischen Achse über der ersten Kanalstruktur. In diesem Fall geschieht das Verschieben der Partikel in die zweite Ebene durch Fokustellung der optischen Käfige.

Gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung werden die Zielpartikel ebenfalls in den jeweiligen dielektrischen Feldkäfigen in optischen Käfigen gehalten, während die Restpartikel in den übrigen dielektrischen Feldkäfigen unbeleuchtet und somit frei von optischen Kräften bleiben. Zur Partikeltrennung werden sämtliche Feldkäfige derart verstimmmt, daß dielektrische Abstoßungskräfte ausgebildet werden, die auf die Partikel in den Feldkäfigen hin zu der zweiten Kanalstruktur gerichtet sind. Darauf hin werden die Restpartikel in die zweite Kanalstruktur übertragen, während die Zielpartikel unter Wirkung der optischen Kräfte trotz der Feldkäfigverstimmung in der ersten Kanalstruktur verbleiben.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Mit dem erfindungsgemäßen Prinzip des seriellen oder parallelen Vermessens einer Vielzahl von Partikeln mit einer anschließenden parallelen Übertragung der Zielpartikel wird der Durchsatz der Partikeltrennung im Vergleich zu den herkömmlichen Techniken erheblich erhöht. Die Vermessung der Partikel in den dielektrischen Feldkäfigen kann schonend ohne nachteilige Auswirkungen auf die Partikel durchgeführt werden. Für die Vermessung steht genügend Zeit zur Verfügung, um die jeweils gesuchten Eigenschaften der Partikel zuverlässig zu ermitteln. Insbesondere das Aussortieren von selten vorkommenden Partikeln in einer großen Ausgangspopulation kann so mit hoher Zuverlässigkeit erfolgen, da alle Partikel einzeln adressierbar sind. Die dielektrischen Feldkäfige oder Feldbarrieren trennen die einzelnen Partikel während der Prozedur räumlich voneinander. Die optischen Käfige ermöglichen ein Erfassen einzelner Partikel ohne Übersprechen auf andere Partikel. Damit wird die Trennschärfe der Partikeltrennung erheblich verbessert. Die Vermessung kann sich auf elektrische und/oder optische Eigenschaften der Partikel beziehen. Die Erfindung ist mit beliebigen Partikeln natürlichen oder synthetischen Ursprungs implementierbar, die in fluidischen Mikrosystemen manipulierbar sind. Ein weiterer Vorteil besteht in der Kompatibilität des Trennverfahrens mit der verfügbaren Mikrosystemtechnik.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

**Fig. 1:** eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer erfindungsgemäßen Trennvorrichtung,

**Fig. 2:** eine schematische Seitenansicht eines Mikrosystems gemäß Fig. 1,

**Fig. 3:** eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer weiteren erfindungsgemäßen Trennvorrichtung,

**Fig. 4:** eine schematische Seitenansicht auf ein Mikrosystem gemäß Fig. 3,

**Fig. 5:** eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems

mit einer zweidimensionalen, flächigen Matrixanordnung von Feldkäfigen und einem für die erfindungsgemäße Ausführung typischen Strömungsprofil,

**Fig. 6:** eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer zweidimensionalen, flächigen Matrixanordnung von Feldbarrieren, und

**Fig. 7:** eine schematische Draufsicht auf einen herkömmlichen Einzelpartikelverteiler (Stand der Technik).

Eine erste Ausführungsform der Erfindung, die in den **Fig. 1** und **2** illustriert ist, basiert auf der Kombination von dielektrischen Feldkäfigen mit verstellbaren optischen Käfigen. Eine erfindungsgemäße Trennvorrichtung **200**, die in ein fluidisches Mikrosystem **100** integriert ist, umfaßt eine Vielzahl dielektrischer Feldkäfige **30**, in denen mit der Lasereinrichtung **40** und der Optik **42** jeweils ein optischer Käfig mit verstellbarem Fokus **41** gebildet ist. Das Bezugszeichen **43** weist auf einen Lichtmodulator, mit dem die optischen Käfige in den Feldkäfigen **30** selektiv ein- bzw. ausgeschaltet werden können.

Die Erzeugung optischer Käfige und deren Verwendung zur Manipulierung mikroskopisch kleiner Partikel ist an sich bekannt (s. z. B. A. Ashkin et al. in "Nature", Bd. 330, 1987, S. 796 ff., und G. Weber et al in "International Review of Cytology", Bd. 133, 1992, S. 1 ff.). Einzelheiten des Laserbetriebs (z. B. Leistung, Wellenlänge etc.) und der Strahlfokussierung können bei der Realisierung des erfindungsgemäßen Systems auf der Grundlage der bekannten Techniken an die konkrete Trennaufgabe angepaßt werden.

Das Mikrosystem **100** umfaßt mindestens zwei Kanalstrukturen **10**, **20**. Die Kanalstrukturen **10**, **20** umfassen jeweils Mikrokanäle oder Mikrokammern mit anwendungsabhängig gewählter Gestalt. Beim dargestellten Beispiel sind beispielsweise zwei in Betriebsfunktion übereinander angeordnete Kanäle vorgesehen. Sie können aber auch nebeneinander angeordnet sein. Die Kanäle sind aus Kunststoff-, Gas oder Halbleitermaterialien mit aus der Mikrosystemtechnik an sich bekannten Verfahren hergestellt und dazu ausgelegt, von Flüssigkeiten mit suspendierten Partikeln durchströmt zu werden. Die Kanäle besitzen charakteristische Dimensionen, die in Abhängigkeit von der Anwendung so gewählt sind, daß ein unbehinderter Suspensionsdurchsatz möglich ist. Dient das Mikrosystem beispielsweise der Manipulierung biologischer Zellen (charakteristische Größe:  $10\text{ }\mu\text{m}$ ), so besitzt jeder Kanal einen typischen Querschnitt, der größer als  $10\text{ }\mu\text{m}$  ist und beispielsweise bis zu  $50\text{ }\mu\text{m}$  beträgt. Zum Trennen synthetischer Partikel (beads), zum Beispiel bei Anwendungen in der kombinatorischen Chemie, können die Kanäle aber auch charakteristische Querschnittsdimensionen im Bereich von  $100$  bis  $200\text{ }\mu\text{m}$  besitzen. Um eine optische Partikelvermessung in den Feldkäfigen zu gewährleisten, werden die Wände des Mikrosystems **100** entsprechend mindestens teilweise transparent gestaltet.

In der ersten Kanalstruktur **10** des Mikrosystems **100** ist eine Vielzahl von Feldkäfigen **30** gebildet. Jeder Feldkäfig **30** umfaßt eine Gruppe von schematisch dargestellten Mikroelektroden **31**, die an den Deck- und Bodenflächen der jeweiligen Kanalstruktur angebracht sind. Die Mikroelektroden **31** sind dazu ausgelegt, mit Hochfrequenzfeldern derart beaufschlagt zu werden, daß sich zwischen den Mikroelektroden **31** eine Feldverteilung ergibt, in der auf dielektrische Partikel Polarisationskräfte erzeugt werden, die die Partikel im Inneren des Feldkäfigs halten. Einzelheiten des Aufbaus und der Ansteuerung von dielektrischen Feldkäfigen und Feldbarrieren sind an sich bekannt (s. z. B. G. Fuhr et al. in "Electromanipulation of Cells", CRT Press Inc., 1996, S. 259 ff.).

Im Mikrosystem **100** ist ferner eine Ladeeinrichtung **50** vorgesehen, die zur Verteilung von Partikeln auf die Feldkä-

fige **30** der Trennvorrichtung **200** ausgelegt ist. Die Ladeeinrichtung **50**, deren Funktion im einzelnen unten erläutert wird, ist jedoch kein zwingendes Merkmal der Erfindung und kann alternativ auch durch andere Lade- oder Aufreihglieder ersetzt werden.

Die Beladung der Beobachtungspositionen oder -felder kann beispielsweise auch passiv durch Transport der Partikelsuspension über den laminaren Flüssigkeitsstrom vorgenommen werden. Das Strömungsprofil in den Mikrokanälen der Vorrichtung ist nicht parabolisch, sondern verläuft über den größten Teil des Kanals – mit Ausnahme der äußersten Randbereiche – geradlinig (siehe **Fig. 5**), da der Kanal erheblich breiter ist, als hoch. So werden die Partikel über den größten Teil des Kanals gleichmäßig schnell transportiert und die Feldkäfige oder Feldbarrieren werden statistisch gleichmäßig beladen. Ablenkelektroden **63** am Rand des Kanals dienen dazu, Partikel aus den strömungsberuhigten Randzonen des Kanals in Zonen mit gleichförmiger Strömung zu befördern. Die Ablenkelektroden können dabei auch Teil von Feldkäfig- oder Feldbarriereelektroden sein. Sollte eine Beobachtungsposition einmal unbesetzt bleiben, ist dies für das weitere Verfahren unerheblich.

Die Kanalstrukturen **10**, **20** sind, abgesehen von Öffnungen **11** im Bereich jedes Feldkäfigs **30**, durch eine durchgehende Wandung voneinander getrennt. Die Aufgabe des Trennverfahrens besteht nun darin, ein in der ersten Kanalstruktur **10** entsprechend der Pfeilrichtung **A** eingeströmtes Partikelgemisch **1** in Zielpartikel **2**, die bei dieser Ausführungsform der Erfindung in die zweite Kanalstruktur **20** übertragen werden sollen, und Restpartikel **3** zu trennen, die in der ersten Kanalstruktur **10** verbleiben sollen. So werden zunächst die Partikel **2** einzeln oder gruppenweise z. B. unter Verwendung der Ladeeinrichtung **50** in die in einer Reihe (siehe **Fig. 1**) angeordneten Beobachtungspositionen (Feldkäfige oder Feldbarrieren) **30** geladen. Die Ladeeinrichtung **50** umfaßt zwei gerade, an den oberen und unteren Kanalseiten angeordnete, streifenförmige Mikroelektroden, die bei Beaufschlagung mit hochfrequenten elektrischen Felder unter Wirkung negativer Dielektrophorese Abstoßungskräfte auf die anströmenden Teilchen ausüben und damit eine schräg zur Strömungsrichtung (Pfeil **A**) verlaufende Feldbarriere bilden. Der erste anströmende Partikel **1a** läuft bei eingeschalteter Feldbarriere zunächst entlang der Pfeilrichtung **B** bis zum Ende der Ladeeinrichtung **50** und dann in den Feldkäfig **30a** (siehe **Fig. 2**). In diesem Zustand ist der Feldkäfig **30a** auf der stromaufwärts gelegenen Seite offen, so daß der Partikel frei bis zum Mittelpunkt **31a** des Feldkäfigs **30a** gelangt. Sobald das Eintreffen des Partikels zum Beispiel mit optischen oder elektrischen Mitteln erfaßt ist, wird der Feldkäfig **30a** auch auf der stromaufwärts gelegenen Seite geschlossen. Die übrigen Feldkäfige **30b**, **30c**, ... werden analog durch Einströmen von Partikeln beladen. Die Ladeeinrichtung **50** wird synchron zum Beladungszustand der Feldkäfige betätigt. An der Ladeeinrichtung **50** sind ggf. weitere Aufreihglieder, Feldkäfige oder Barrieren zur Anordnung der anströmenden Partikel vorgesehen.

Wenn alle Feldkäfige mit Partikeln beladen sind, erfolgt die Vermessung zur Bestimmung physikalischer und/oder biologisch-chemischer Parameter der Partikel. Diese Vermessung erfolgt beispielsweise auf optischem Wege (zum Beispiel Fluoreszenz- oder Streulichtmessung) und/oder auf elektrischem Wege (zum Beispiel Elektrotationsmessung in den Feldkäfigen). Es kann auch vorgesehen sein, mit der Suspensionsflüssigkeit im Mikrosystem Zusatzstoffe zu den Feldkäfigen zu spülen, deren Wechselwirkung mit den gehaltenen Partikeln optisch und/oder elektrisch erfaßt wird. Die Feldkäfige, in denen sich die Zielpartikel mit vorbestimmten Parametern befinden, werden zur Vorbereitung

des folgenden Trennschrittes erfaßt.

Zur gleichzeitigen Übertragung der Zielpartikel in die zweite Kanalstruktur **20** wird der Lichtmodulator **43** derart betätigt, daß eine Laserbestrahlung in die erfaßten Feldkäfige mit den Zielpartikeln freigegeben wird. Durch diese Bestrahlung wird jeweils ein optischer Käfig gebildet, dessen Fokus **41** mit dem Zentrum (z. B. **31a**) des dielektrischen Feldkäfigs **30** übereinstimmt. Die Zielpartikel werden in den optischen Käfigen wie mit einer Laserpinzette gefangen. Anschließend wird gleichzeitig für alle optischen Käfige der Fokus **41** durch die Öffnung **11** zwischen den Kanalstrukturen (Pfeil **C'**) verschoben. Diese Verschiebung erfolgt beispielsweise durch Verstellung der Optik **42**. Sobald die Zielpartikel mit dem verschobenen Fokus in die zweite Kanalstruktur **20** übertragen worden sind, wird mit dem Lichtmodulator **43** die Laserstrahlung abgeschaltet. Dadurch werden die Zielpartikel freigegeben, um einer weiteren Bewegung und/oder Bearbeitung in der zweiten Kanalstruktur **20** unterzogen zu werden. Simultan werden die Feldkäfige **30** in der ersten Kanalstruktur **10** auf der stromabwärts gelegenen Seite geöffnet, so daß die Restpartikel **3** ebenfalls freigegeben werden. Die Ziel- bzw. Restpartikel **2, 3** können jeweils einer oder mehreren weiteren Trennungen nach dem erläuterten Prinzip unterzogen werden, um eine Sortierung in eine Vielzahl von Partikelgruppen vorzunehmen.

Die Trennvorrichtung **200** umfaßt insbesondere die Lasereinrichtung **40**, deren Licht mit der Optik **42** zur Bildung des Fokus **41** gebündelt wird, und den Lichtmodulator **43**. Die Lasereinrichtung **40** umfaßt eine Laserdiodenanordnung oder einen einzelnen Laser mit einer Strahlaufweitungsoptik. Es können auch mehrere Laserstrahlen zur Bildung jeweils eines optischen Käfigs vorgesehen sein. Bei der Laserdiodenanordnung sind eine Vielzahl von Laserdioden entsprechend der Position der Feldkäfige oder Feldbarrieren im Mikrosystem ausgerichtet. Beim Einsatz eines einzelnen Lasers hingegen wird die gesamte Anordnung der Feldkäfige mit dem einzelnen aufgeweiteten Strahl beleuchtet. Die Lasereinrichtung **40** wird vorzugsweise bei einer Wellenlänge betrieben, die sich zur Ausbildung effektiver optischer Käfige bei möglichst geringer Lichtleistung besonders gut eignet. Bei den meisten Anwendungen wird die Wellenlänge im infraroten oder roten Spektralbereich gewählt.

Der Lichtmodulator **43** ist ein Transmissions- oder Reflektions-Modulator. Als Transmissions-Modulator sind an sich bekannte Mikroschutteranordnungen verwendbar, bei denen eine Vielzahl von Mikroschuttern entsprechend der Position der Feldkäfige ausgerichtet ist. Es werden mechanische Mikroschutter oder schaltbare Flüssigkristall-Anordnungen verwendet. Als Reflektions-Modulator kann eine schaltbare Matrix von Spiegelementen (sog. Digital Mirror Array) verwendet werden. Alternativ ist es bei Ausbildung der Lasereinrichtung **40** mit einer Laserdiodenanordnung auch möglich, den Lichtmodulator in die Lasereinrichtung **40** zu integrieren. In diesem Fall ist der Lichtmodulator eine Steuerschaltung, mit der die einzelnen Laserdioden individuell ein- bzw. ausgeschaltet werden können.

Die Optik **42** umfaßt eine Mikrolinsen-Anordnung aus einer Vielzahl von Mikrolinsen, die entsprechend den Positionen der Feldkäfige ausgerichtet sind. Die Mikrolinsenanordnung ist zur Verstellung des Fokus **41** vertikal beweglich angebracht, wie es an sich von Laserpinzetten bekannt ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Vermessung der Partikel in den Feldkäfigen unter Verwendung einer optischen Detektoreinrichtung, die beispielsweise durch einen Array-Detektor auf der Basis von CCD-, CID, CMOS-APD oder PD-Anordnungen gebildet ist. Die Detektoreinrichtung wird vorzugsweise auf der relativ zur

Lasereinrichtung **40** gegenüberliegenden Seite des Mikrosystems **100** angebracht. Die Detektorelemente der Detektoreinrichtung sind vorzugsweise für eine wellenlängenselektive Lichterfassung ausgelegt. Hierzu sind Filtereinrichtungen, die ggf. in die Detektoreinrichtung integriert sind, vorgesehen. Die wellenlängenselektive Messung dient insbesondere der Fluoreszenzmessung an den Partikeln.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung, die ebenfalls mit der in den Fig. 1 und 2 illustrierten Anordnung implementiert werden kann, basiert auf der Kombination optischer Käfige mit verstellbaren dielektrischen Feldkäfigen. Bei dieser Gestaltung werden zunächst, wie oben beschrieben wurde, die Partikel des Ausgangsgemisches **1** in den Feldkäfigen **30** positioniert und vermessen. Um nun die Ziel- und Restpartikel voneinander zu trennen, wird in Abhängigkeit vom Meßergebnis für eine Gruppe von Feldkäfigen **30**, die beispielsweise die Zielpartikel enthält, mit dem Lichtmodulator **43** die Laserbestrahlung freigegeben. Dadurch wird jeder Zielpartikel in einem optischen Käfig gefangen. Zur Trennung der Partikel werden nun sämtliche Feldkäfige **30** derart verstimmt, daß eine resultierende dielektrische Kraft auf die Partikel durch die Öffnung **11** hin in die zweite Kanalstruktur **20** ausgeübt wird. Dieser Kraftwirkung folgen alle Partikel, die nicht zusätzlich durch den optischen Käfig gehalten werden, so daß sich eine entsprechende Sammlung in der zweiten Kanalstruktur **20** ergibt. Die beleuchteten Partikel (z. B. Zielpartikel) bleiben in diesem Fall in der ersten Kanalstruktur **10**. Nach Freigabe der optischen bzw. dielektrischen Kräfte werden die Ziel- bzw. Restpartikel in der ersten bzw. zweiten Kanalstruktur **10, 20** weiter transportiert.

Eine weitere abgewandelte Ausführungsform der Erfindung, die entsprechend einem der beiden oben genannten Kombinationsprinzipien betrieben werden kann, ist in den Fig. 3 und 4 illustriert. Das Mikrosystem **100** enthält wiederum zwei übereinander angeordnete Kanalstrukturen **10, 20** mit zumindest teilweise transparenten Kanalwänden. Auf den inneren Deck- bzw. Bodenflächen der Kanalstrukturen sind anwendungsabhängig gestaltete Mikroelektroden zur Erzeugung von Feldkäfigen und/oder Barrieren ausgebildet. Im Unterschied zu der in Fig. 1 gezeigten Feldkäfigreihe umfaßt die Trennvorrichtung **200** bei dieser Ausführungsform eine flächige Matrixanordnung von Feldkäfigen **30** in geraden Reihen und Spalten. So sind mehrere Reihen von Beobachtungspositionen in Strömungsrichtung hintereinander angeordnet. Dies hat einerseits den Vorteil, daß individuelle Partikel mehrmals hintereinander bewertet werden können, was die Zuverlässigkeit der Analyse und damit auch der Trennung beträchtlich verbessert. Auf der anderen Seite erhöht ein solches zweidimensionales Array an Beobachtungsfeldern erheblich den Durchsatz an Partikeln, die gleichzeitig bewertet werden.

Eine weitere abgewandelte Ausführungsform der Erfindung hinsichtlich der Form der Elektroden zur Ausbildung von Feldkäfigen **60** zeigt die Fig. 5. Hier werden die einzelnen Feldkäfige durch Zinken- oder Kamm-artige Elektroden (**61a, 61b, 61c . . .**) gebildet. Die Partikel **62a, 62b, 62c . . .** ordnen sich in einer solchen Anordnung in den Zwischenräumen der Zinken an. Diese Elektrodenform hat vor allem Vorteile hinsichtlich einer einfachen Elektrodenprozessierung mit verbundenen Zuleitungen.

Eine weitere Abwandlung der Erfindung ist in Fig. 6 demonstriert. Hier werden keine vollständigen Feldkäfige geformt, sondern Feldbarrieren **70** mithilfe von Elektroden, wie bei **70a, 70b, 70c . . .** gezeigt. Die Partikel **71a, 71b, 71c . . .** werden durch einen stetigen Flüssigkeitsstrom **72** gegen die dielektrischen Feldbarrieren gedrückt und so an den jeweiligen Beobachtungspositionen gehalten.

Erfindungsgemäß können verschiedene Richtungen der Bestrahlung durch die Lasereinrichtung 40 vorgesehen sein. Gemäß Fig. 4 erfolgt die Bestrahlung von der Unterseite des Mikrosystems, d. h. von der Seite der ersten Kanalstruktur 10 her. Dementsprechend besteht mindestens der Kanalboden 12 aus einem transparenten Material. Eine optische Vermessung der in den Feldkäfigen 30 gefangenen Partikel kann ebenfalls von der Unterseite des Mikrosystems 100 her oder auch von der entgegengesetzten Seite her erfolgen. Das Licht von der Lasereinrichtung 40 wird wiederum über einen Lichtmodulator 43 und über eine Optik 42 in die Feldkäfige 30 fokussiert.

Bei der in den Fig. 3 und 4 gezeigten Ausführungsformen ist als Ladeeinrichtung 50 eine Aufreihung von Feldkäfigen vorgesehen. Die in der ersten Kanalstruktur 10 anströmenden Partikel 1 (zu trennendes Gemisch) werden zunächst in der Ladeeinrichtung 50 positioniert. Sobald jeder Feldkäfig 51 der Ladeeinrichtung 50 einen Partikel enthält, wird die gesamte Reihe der Feldkäfige 51 und die benachbarte Reihe der Feldkäfige 30a so angesteuert, daß die Partikel in die Feldkäfige 30a übernommen werden. Anschließend werden die Feldkäfige 51 der Ladeeinrichtung 50 erneut beschickt. Wiederum werden die Partikel an die Feldkäfige 30a und von dieser zur Reihe der Feldkäfige 30b weitergegeben, bis schrittweise alle Reihen der Feldkäfige 30 gefüllt sind. Anschließend erfolgt die Vermessung und die Trennung der Partikel nach den oben erläuterten Prinzipien.

Ein wichtiger Vorteil der in den Fig. 1 bis 6 gezeigten Ausführungsformen der Erfindung besteht darin, daß sämtliche dielektrischen Feldkäfige simultan angesteuert werden. Dadurch werden Störfelder oder ein Übersprechen zwischen den Feldkäfigen vermieden, wodurch die Genauigkeit der erfindungsgemäßen Trennung insbesondere im Vergleich zu der unter Bezug auf Fig. 5 erläuterten herkömmlichen Technik erheblich verbessert wird.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Partikeltrennung ausschließlich unter der Wirkung optischer Kräfte. Bei dieser (nicht dargestellten) Ausführungsform werden die zu trennenden Partikel nicht in dielektrischen Feldkäfigen, sondern an mechanisch ausgebildeten Halterungen im Mikrosystem positioniert. Derartige Halterungen werden beispielsweise durch Löcher in der Kanalwandung gebildet. Nach der Partikelvermessung wird die Gruppe der Zielpartikel in entsprechende optische Käfige aufgenommen und mit diesen von den Halterungen weg in die benachbarte Kanalstruktur gehoben.

Bei einer weiteren Abwandlung des oben erläuterten Trennprinzips ist vorgesehen, daß drei Kanalstrukturen zueinander benachbart angeordnet sind, wobei das Positionieren und Vermessen der Partikel in der mittleren Kanalstruktur und das Übertragen von Zielpartikeln in die benachbarte Kanalstruktur erfolgt, indem zunächst eine erste Gruppe von Zielpartikeln z. B. in die obere Kanalstruktur und anschließend eine weitere Gruppe von Zielpartikeln in die untere Kanalstruktur übertragen wird.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Partikeltrennung, bei dem aus einem Partikelgemisch (1) aus einer Vielzahl von Partikeln in einem fluidischen Mikrosystem Zielpartikel (2) mit vorbestimmten Partikeleigenschaften von Restpartikeln (3) getrennt werden, mit den Schritten:

– Positionieren von Partikeln des Partikelgemisches (1) in Beobachtungsfeldern an Funktionselementen (30) in einer ersten Kanalstruktur (10) des Mikrosystems (100), wobei die Funktionselemente Elektrodenanordnungen aufweisen, an de-

nen inhomogene elektrische Felder erzeugt werden, die abstoßende oder anziehende dielektrophoretische Kräfte auf die Partikel ausüben,

– Vermessen der Partikel in den Beobachtungsfeldern zur Ermittlung der Partikeleigenschaften und Erfassen der Beobachtungsfelder, die die Zielpartikel (1) bzw. die Restpartikel (3) enthalten,

– Ausbilden optischer Käfige an den Beobachtungsfeldern, die die Ziel- oder Restpartikel enthalten, unter Verwendung einer Lichtmodulatoreinrichtung, mit der die optischen Käfige einzeln ein- oder ausgeschaltet werden können, und

– gleichzeitiges Übertragen der Ziel- oder Restpartikel von ihren jeweiligen Beobachtungsfeldern in eine benachbarte zweite Kanalstruktur (20) des Mikrosystems, wobei optische Kräfte der optischen Käfige und dielektrische Polarisationskräfte der Funktionselemente (30) zusammenwirken.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum Übertragen der Partikel die Fokuspunkte (41) der optischen Käfige mit den Ziel- oder Restpartikeln simultan von der ersten in die zweite Kanalstruktur (20) verschoben werden, während die jeweils übrigen Partikel in der ersten Kanalstruktur (10) bleiben.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Funktionselemente als elektrische Feldkäfige (30) verwendet werden.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem zum Übertragen der Partikel die dielektrischen Feldkäfige (30) einseitig hin zur zweiten Kanalstruktur (20) geöffnet und die Ziel- oder Restpartikel mit den optischen Käfigen in den dielektrischen Feldkäfigen gehalten werden, während sich die jeweils übrigen Partikel in die zweite Kanalstruktur (20) bewegen.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zum Vermessen der Partikel optische Messungen und/oder elektrische Messungen durchgeführt werden.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem die optischen Messungen Fluoreszenz- und Streulichtmessungen umfassen.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem zu den optischen Messungen eine Lasereinrichtung verwendet wird, die auch zur Bildung der optischen Käfige ausgelegt ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem die elektrischen Messungen Elektrorotationsmessungen an den Partikeln umfassen.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Lichtmodulatoreinrichtung zur Bildung der optischen Käfige eine Mikroshutteranordnung und/oder eine schaltbare Matrix aus Spiegelementen an den jeweils erfaßten Funktionselementen oder dielektrischen Feldkäfigen (30) mit den Ziel- oder Restpartikeln betätigt wird.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel in einer Flüssigkeit suspendiert sind, die mit einem Flüssigkeitstransportsystem durch das Mikrosystem befördert wird.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, bei dem als Flüssigkeitstransportsystem eine Spritzenpumpe, eine peristaltische Pumpe, eine Membranpumpe, eine Zahnradpumpe, eine elektroosmotische Pumpe und/oder eine piezoelektrische Pumpe verwendet werden.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel Strömungskräften und elektrischen Kräften der Elektrodenanordnungen aus-

gesetzt sind, um die Partikel aufgereiht und/oder verteilt an die Beobachtungsfelder zu führen.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Ziel- bzw. Restpartikel (2, 3) nach der Partikeltrennung in verschiedene Auffangeinheiten überfördert werden.

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel synthetische Partikel, biologische Zellen, Zellverbände, Zellbestandteile, Makromoleküle, Makromoleküverbände, Bakterien, Viren, Alginat-Beads oder Verbundpartikel aus synthetischen und natürlichen Teilen umfassen.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, bei dem die Partikel sphärische Polymere (Beads) aus organischem (z. B. Polystyrol, Alginat) oder anorganischem (z. B. Silikagel) Material, eukariotische oder prokariotische Zellen, Zellverbände und/oder Aggregate aus diesen umfassen, wobei die Aggregate sowohl aus gleichen als auch unterschiedlichen Spezies bestehen können.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, bei dem die Partikel vor dem Einbringen in das Mikrosystem oder im Mikrosystem mit einer magnetischen oder einer fluoreszierenden Sondensubstanz markiert werden.

17. Trennvorrichtung zum Trennen eines Partikelgemisches (1) aus Zielpartikeln (2) mit vorbestimmten Partikeleigenschaften und Restpartikeln (3) in einem fluidischen Mikrosystem, die umfaßt:

- eine erste Kanalstruktur (10) mit einer Vielzahl von Funktionselementen (30) und einer Ladeeinrichtung (50) zum Positionieren von Partikeln des Partikelgemisches (1) an den Funktionselementen (30),
- eine zweite Kanalstruktur (20), die an den Positionen der Funktionselemente (30) mit der ersten Kanalstruktur (10) über Öffnungen (11) verbunden ist,
- eine Lasereinrichtung (40), die zur Bildung jeweils eines optischen Käfigs an jedem Funktionselement (30) ausgelegt ist, und
- einen Lichtmodulator (43), mit dem die optischen Käfige an den Funktionselementen (30) ein- oder ausgeschaltet werden können.

18. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der eine verstellbare Optik (42) vorgesehen ist, mit der die Fokuspunkte (41) der optischen Käfige von den Funktionselementen (30) in der ersten Kanalstruktur (10) in die zweite Kanalstruktur (20) verstellbar sind.

19. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 17 oder 18, bei der eine Meßvorrichtung zur Ermittlung optischer und/oder elektrischer Partikeleigenschaften vorgesehen ist.

20. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 19, bei der die Meßvorrichtung eine Detektoreinrichtung umfaßt, die relativ zur Lasereinrichtung (40) auf der entgegengesetzten Seite des Mikrosystems (100) angeordnet ist.

21. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, bei der der Lichtmodulator (43) eine Mikroshutteranordnung oder eine schaltbare Matrix von Spiegelementen umfaßt.

22. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, bei der die Funktionselemente Elektrodenanordnungen zur Erzeugung inhomogener elektrischer Felder, die abstoßende oder anziehende dielektrophoretische Kräfte auf die Partikel ausüben, in der ersten Kanalstruktur (10) umfassen.

23. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 22, bei der die Elektrodenanordnungen elektrische Feldkäfige (30, 60) oder elektrische Feldbarrieren (70) bilden.

24. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17

bis 23, die ein Flüssigkeitstransportsystem auf der Basis einer Spritzenpumpe, einer peristaltischen Pumpe, einer Membranpumpe, einer Zahnradpumpe, einer elektroosmotischen Pumpe und/oder einer piezoelektrischen Pumpe aufweist.

25. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 19 bis 24, bei dem die Meßvorrichtung einen optischen Array-Detektor auf der Basis eines CCD- CID-CMOS-, APD- oder PD-Arrays ist.

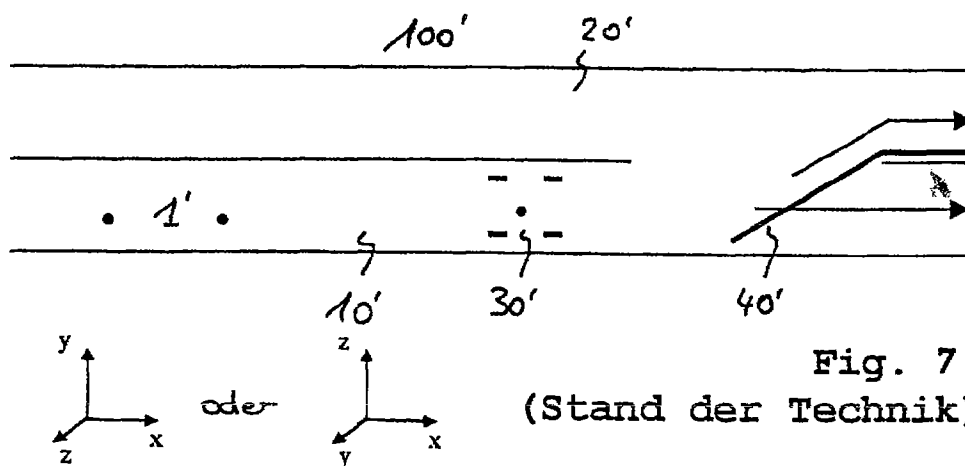
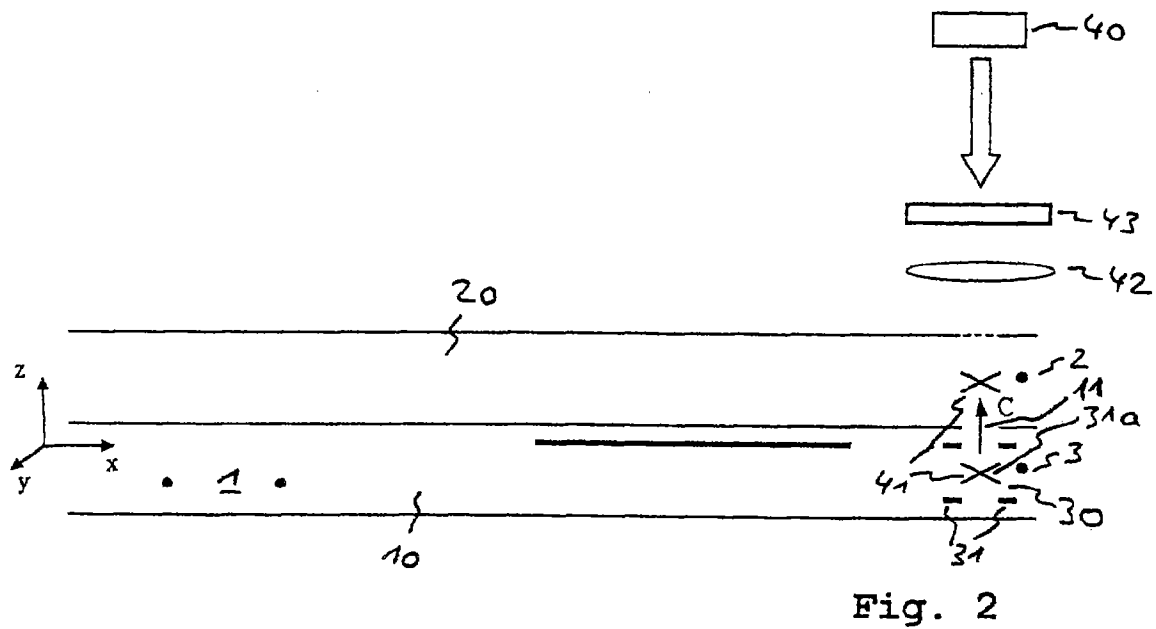
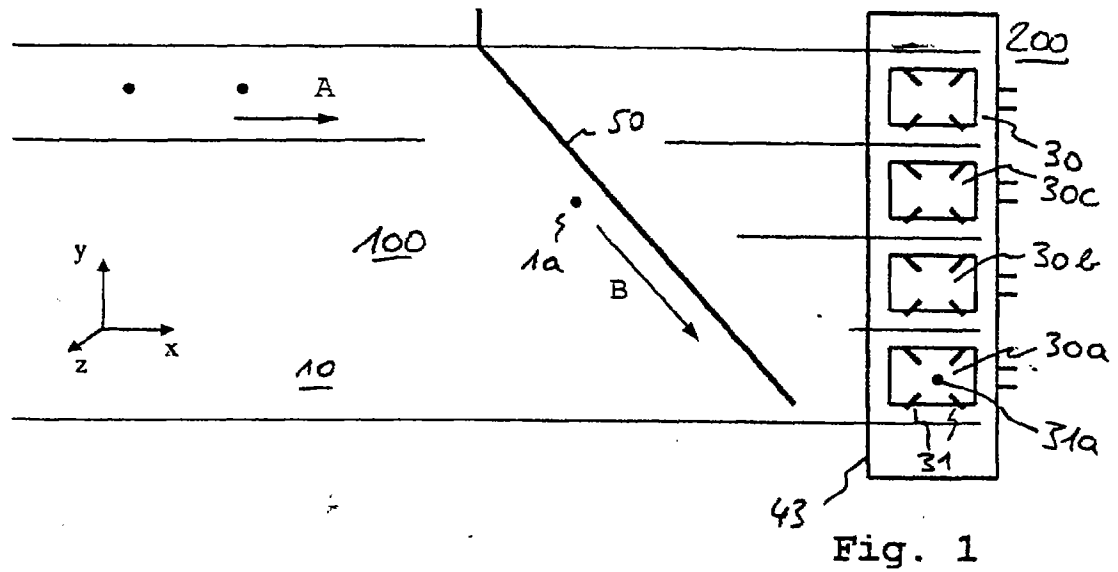
26. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 25, bei der der Array-Detektor eine Vielzahl von Detektorelementen umfaßt, die zumindest zum Teil mit wellenlängenselektiven Schichten versehen sind.

27. Verwendung eines Verfahrens oder einer Trennvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Trennung von Partikelgemischen in fluidischen Mikrosystemen.

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---





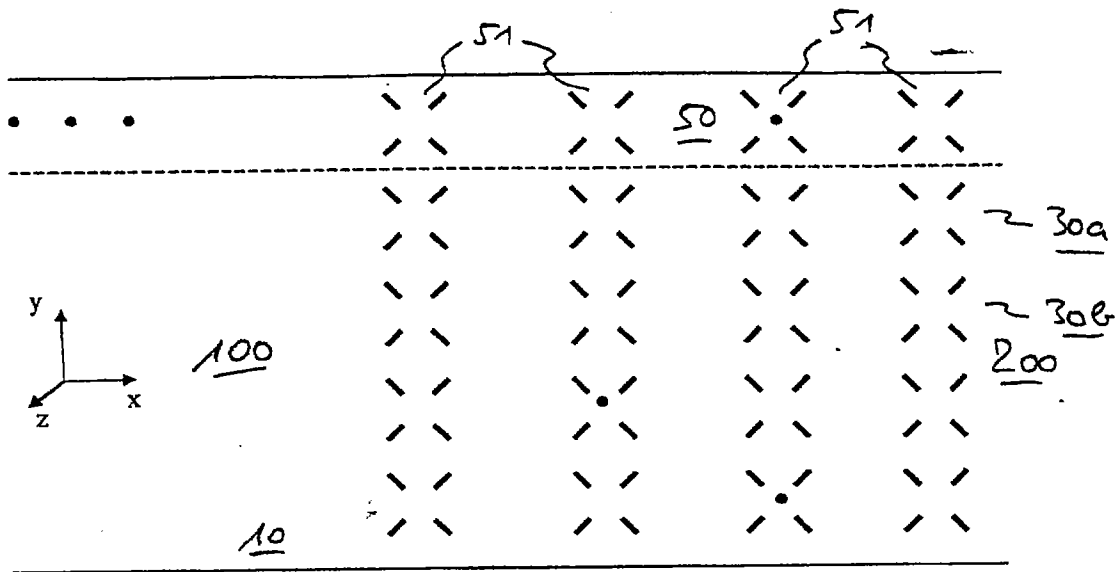


Fig. 3

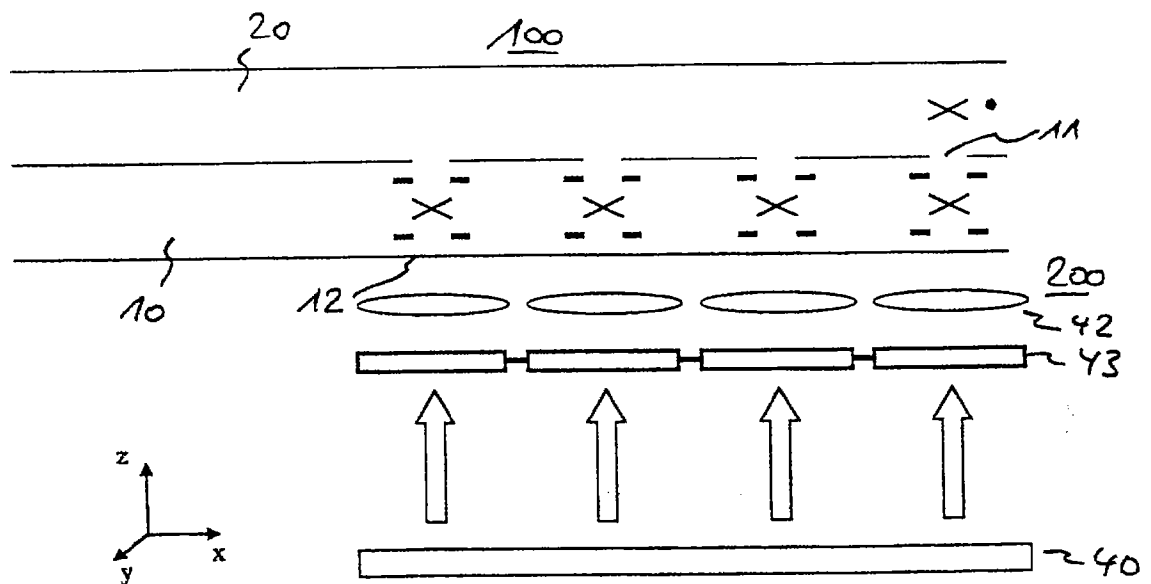


Fig. 4

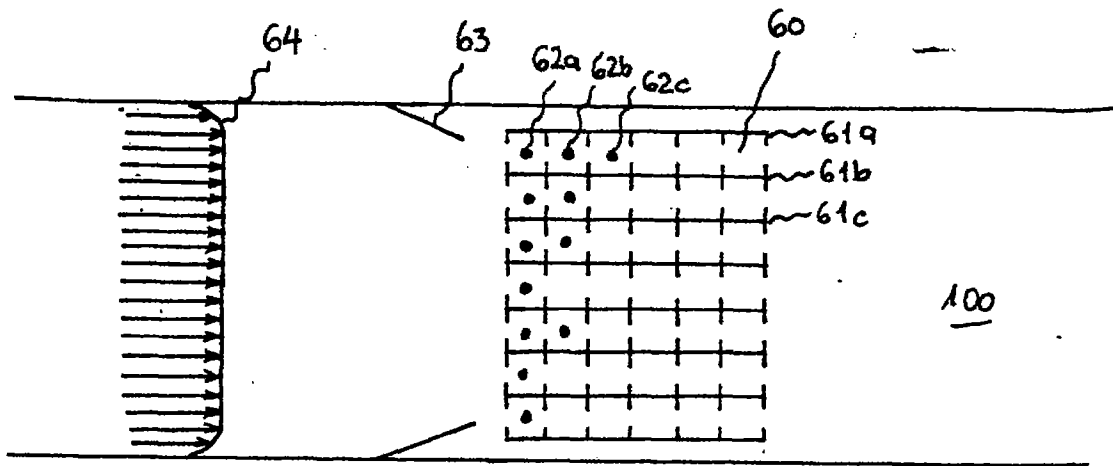


Fig. 5

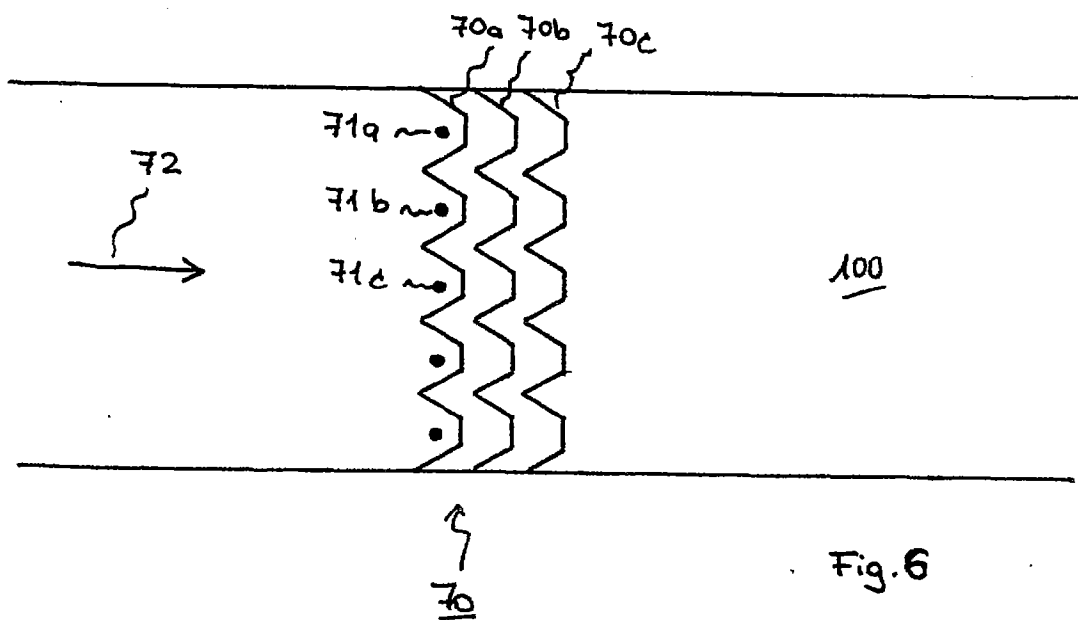


Fig. 6